การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลคติก โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน
Screening of microorganisms producing lactic acid using glycerol as a sole carbon source

จิราภรณ์ บุราคร[1]*, นงลักษณ์ บรรยงวิมลณัฐ[1], สุพะไชย์ จินดาวุฒิกุล[1], ธิรดา สุขธรรม[1], ปวิน งามเลิศ[1]
Jiraporn Burakron[1]*, Nongluk Bunyovimonnat[1], Supachai Jindavutikul[1], Thirada Suktham[1], Pawin Ngamlert[1]

บทคัดย่อ

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลคติกโดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว โดยนำตัวอย่างที่คาดว่าจะมีเชื้อจุลินทรีย์ที่มีสมบัติที่ต้องการจากแหล่งต่างๆ จำนวน 14 แหล่ง ได้แก่ น้ำฮอร์โมนน้ำดำ น้ำผักดอง น้ำหน่อไม้ดอง น้ำเอนไซม์ผสมน้ำผลไม้รวม ปุ๋ยน้ำ น้ำหมักชีวภาพยี่ห้อน้องเดือน น้ำหมักชีวภาพยี่ห้อเทศบาล น้ำหมักชีวภาพ EM ดินที่ปนเปื้อนกลีเซอรอลดิบ น้ำทิ้งที่ปนเปื้อนกลีเซอรอลดิบ น้ำหมักชีวภาพจาก จ.เชียงใหม่ น้ำหมักมะกรูด น้ำหมักลูกยอ น้ำหมักยี่ห้อพลอยเพชร มาทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนและแคลเซียมคาร์บอร์เนต จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างจากน้ำหมัก EM ให้ขนาดวงใสรอบโคโลนีกว้างที่สุด จึงคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์มา 18 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ EM335 มีขนาดวงใสรอบโคโลนีกว้างที่สุด เท่ากับ 17.07 มิลลิเมตร และเมื่อทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลีเซอรอลดิบพบว่า สายพันธุ์ EM383 เจริญเติบโตได้ดีที่สุด จากนั้นจึงนำสายพันธุ์ EM335, EM383 และ EM335 ผสมกับ EM383 ทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลีเซอรอลดิบกลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99 และกลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ EM335 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุด คือ 84.76 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน

Abstract

Microorganisms which produce lactic acid by using glycerol as a sole carbon source were identified from various sources, 14 samples such as soil and waste water contaminated with crude glycerol from biodiesel production process, EM bio-extract samples etc. The microorganisms from these samples were selected by cultivated in crude glycerol as a sole carbon source and calcium carbonate. As the results, EM-bio-extract had the widest clear zone and the other samples had very narrow clear zone and some of them no clear zone. Therefore, the 18 microorganisms from EM bio-extract samples which had the most widest clear zone were continued to investigate growth rate and lactic acid production. The results showed that the EM383 was the most rapid growth and the EM335 had the widest clear zone as 17.07 mm. After that, the EM335, the EM383 and the EM335 mixed with the EM383 were cultivated in medium containing crude glycerol, 99% glycerol and 99.5% glycerol. It was found that the EM335 produced the highest amount of lactic acid as 84.76 µg/L when it was cultivated in medium containing crude glycerol as a sole carbon source.

คำสำคัญ : กรดแลคติก, กลีเซอรอล, ไบโอดีเซล, จุลินทรีย์
Keywords : Lactic acid, Glycerol, Biodiesel, Microorganism

[1]กรมวิทยาศาสตร์บริการ
*Corresponding author E-mail address : bjiraporn@dss.go.th

1. บทนำ (Introduction)

ไบโอดีเซลเป็นพลังงานทางเลือกที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาเอสเทริฟิเคชันกับไขมันพืชหรือไขมันสัตว์ ได้กลีเซอรอลดิบเป็นผลพลอยได้ประมาณร้อยละ 10 ของไบโอดีเซลที่ผลิตได้ (1) กลีเซอรอลดิบปนเปื้อนสารเคมี ตัวเร่งปฏิกิริยา กรดไขมัน เอธานอล เป็นต้น (2) ปัจจุบันความต้องการไบโอดีเซลจะสูงขึ้นเรื่อยๆ ทั่วโลกจึงหันมาผลิตไบโอดีเซลโดยสหภาพยุโรปเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ของโลก ผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นจากประมาณ 3.2 ล้านตัน ในปี 2005 เป็น 5.71 ล้านตันในปี 2007 ในสหรัฐอเมริกาผลิตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จาก 25 ล้านแกลลอนในปี 2004 เป็น 450 ล้านแกลลอนในปี 2007 (3) การเพิ่มจำนวนการผลิตไบโอดีเซลอย่างรวดเร็วนอกจากในประเทศพัฒนาแล้วยังมีประเทศที่กำลังพัฒนา เช่น จีน บราซิล อาเจนตินา อินโดนีเซียและมาเลเซีย เป็นต้น (4) ดังนั้นปริมาณกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจึงมีจำนวนมหาศาล คาดว่าทั่วโลกจะผลิตไบโอดีเซลถึง 37,000 ล้านแกลลอน เมื่อถึงปี 2016 ซึ่งเติบโตขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 42 ต่อปี (3) ดังนั้นกลีเซอรอลดิบจะผลิตออกมา ประมาณ 4,000 ล้านแกลลอน และในประเทศไทยมีโรงงานที่สามารถผลิตไบโอดีเซลได้กว่า 400,000 ลิตรต่อวัน เป็นภาระของผู้ผลิตไบโอดีเซลที่จะต้องขายในราคาต่ำ เนื่องจากกลีเซอรอลมีการปนเปื้อนสารเคมีไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย กลีเซอรอลดิบเป็นสาเหตุทำให้ต้นทุนกระบวนการผลิตไบโอดีเซลสูงขึ้น และจะเป็นปัญหาต่อไปในอนาคต ถ้าหากไม่รีบดำเนินการพัฒนานำกลีเซอรอลดิบไปใช้ประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่า

งานวิจัยนี้เป็นการผลิตกรดแลคติกโดยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ โดยการคัดเลือกหาสายพันธุ์จุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆที่สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวซึ่งกรดแลคติกมีมูลค่าสูงราคา การนำเข้าประมาณ 30-120 บาท ต่อกิโลกรัมสำหรับเกรดอาหารระดับเภสัชภัณฑ์เกรด ซึ่งประเทศไทยมีการนำเข้าปีละกว่า 9.4 ล้านบาท เนื่องจากมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมการเกษตร (5)(6) รวมถึงการใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic) ชนิด Poly-lactic ซึ่งมีแนวโน้มจะใช้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในปริมาณสูงมาก เนื่องจากทั่วโลกกำลังมีปัญหาสิ่งแวดล้อมและรณรงค์ให้ทุกประเทศหันมาใช้พลาสติกที่ไม่เป็นมลภาวะไม่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม

2. วิธีการวิจัย (Experimental)

2.1 วัตถุดิบและสารเคมี

- กลีเซอรอลดิบ (Crude glycerol) จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล วิสาหกิจชุมชนสมุทรสาครพัฒนาพลังงานทดแทน อ. กระทุ่มแบน จ. สมุทรสาคร
- กลีเซอรอลบริสุทธิ์ ความเข้มข้นร้อยละ 99 ที่ได้จากกลีเซอรอลดิบ
- กลีเซอรอลบริสุทธิ์ (Glycerol, C3H5(OH)3) ความเข้มข้นร้อยละ 99.5
- คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate)
- แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Calcium hydroxide)
- กรดซัลฟุริก (Sulfuric acid)
- พาราไฮดรอกซีไดฟีนีล (p-hydroxydiphenyl)
- ลิเทียมแลกเทต (Litium lactate)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Enrichment medium
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar
- อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ผสม 0.5% CaCO3
- แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate)
- น้ำปราศจากไอออน (D.I. water)

2.2 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ

- ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
- บีกเกอร์ (Beaker)
- กระบอกฉีดยา (Syringe)
- หลอดทดลอง (Test tube)
- ไมโครปิเปต (Micropipette)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet Level ll)

- ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
- ตู้อบเพาะเชื้อแบบใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator)
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV/VIS Spectrophotometer)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance)
- เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)

2.3 การเตรียมสารละลาย

2.3.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานลิเทียมแลกเทต

1) เตรียมสารละลายลิเทียมแลกเทตที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2) เตรียมสารละลายลิเทียมแลกเทตที่มีความเข้มข้นต่างๆ จากสารละลายลิเทียมแลกเทตที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรดังแสดงในตาราง

Table 1 Litium lactate solution preparation

Litium lactate (µg/ml)	Litium lactate solution 1mg/ml (µl)	Water (µl)
0	0	1000
20	20	980
40	40	960
60	60	940
80	80	920

3) ดูดสารละลายลิเทียมแลกเทต 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองความเข้มข้นละ 2 หลอด

4) เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปในสารละลายข้อ 3) ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตรโดยใช้น้ำกลั่น จากนั้นเติมผงแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไปเขย่าแรงๆ โดยใช้เครื่องผสม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว

5) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายด้านบนมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร

6) นำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำเย็น ค่อยๆเติมสารละลายกรดซัลฟุริก ลงไปข้าๆ ผสมให้เข้ากันทันที

7) นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วย้ายมาที่อ่างน้ำเย็นทันที (อุณหภูมิน้อยกว่า 20 องศาเซลเซียส)

8) หยดสารละลายพาราไฮดรอกซีไดฟีนีล 2 หยด ผสมด้วยเครื่องผสม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 90 วินาที แล้วทำให้เย็นทันที

9) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

10) เขียนกราฟมาตรฐานของสารละลายลิเทียมแลกเทตระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของสารละลายลิเทียมแลกเทตพร้อมหาค่าความชันของกราฟเส้นตรง

11) กรณีของหลอดควบคุม ดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่างโดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

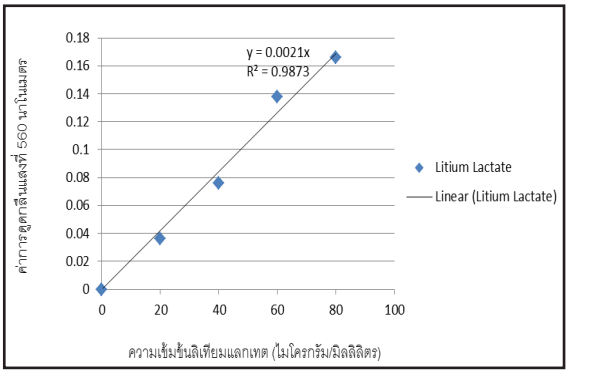

Figure 1 Standard graph of Lithium lactate

2.4 การคัดเลือกหาเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างแหล่งต่าง ๆ ที่สามารถผลิตกรดแลคติก

ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ จำนวน 14 แหล่ง ได้แก่ น้ำฮอร์โมนน้ำดำ น้ำผักดอง น้ำหน่อไม้ดอง น้ำเอนไซม์ผสมน้ำผลไม้รวม ปุ๋ยน้ำ น้ำหมักชีวภาพยี่ห้อน้องเดือน น้ำหมักชีวภาพยี่ห้อเทศบาล น้ำหมักชีวภาพ EM ดินที่ปนเปื้อนกลีเซอรอลดิบ น้ำทิ้งที่ปนเปื้อนกลีเซอรอลดิบ น้ำหมักชีวภาพจาก จ.เชียงใหม่ น้ำหมักมะกรูด น้ำหมักลูกยอ น้ำหมักยี่ห้อพลอยเพชร นำมาคัดเลือกหาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลคติกโดยใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว ประยุกต์จากวิธีของ Hong et al., 2009 ดังนี้

2.4.1 ชั่งตัวอย่างดิน 5 กรัมและปิเปตตัวอย่างน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร

2.4.2 เจือจางตัวอย่างด้วย 0.85% NaCl ให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อ 10^{-1}-10^{-10}

2.4.3 ดูดตัวอย่างจากข้อ 2.4.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยให้กระจายบนผิวหน้าอาหาร Nutrient agar เพาะเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.4.4 คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากข้อ 2.4.3 โดยใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อ จิ้มโคโลนีเชื้อมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ผสม 0.5% $CaCO_3$ เพาะเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดขนาดวงใสรอบโคโลนี

2.5 การเจริญเติบโตสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก

จุลินทรีย์ทั้งหมดที่คัดแยกได้จากข้อ 2.4 จำนวน 4,884 ไอโซเลท บางไอโซเลทให้ขนาดวงใสรอบโคโลนีกว้าง บางไอโซเลทไม่มีวงใสรอบโคโลนี จากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่มีวงใสรอบโคโลนีกว้างที่สุดจำนวน 18 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงในอาหาร enrichment medium (0.3% Yeast extract, 0.2% Beef extract, 0.5% Peptone, 3.0% Glycerol, 0.3% NaCl, 0.2% K_2HPO_4 รับเป็น pH 7.0) ผสมกลีเซอรอลดิบปริมาณ 10 มิลลิลิตร ในสภาวะไร้อากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง นับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และทำการแยกเชื้อโดยวิธี Pour plate นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.6 ศึกษาการผลิตกรดแลคติกของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้กลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน

นำจุลินทรีย์จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ EM335 ที่มีขนาดวงใสรอบโคโลนีกว้างที่สุด และ EM 383 ซึ่งมีการเจริญเติบโตดีที่สุด มาศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยใช้กลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนี้

2.6.1 ตัวอย่าง EM335 EM383 และ EM335 รวมกับ EM383 รวมเป็น 3 ตัวอย่าง นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว enrichment medium ผสมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ ความเข้มข้นร้อยละ 99.5 อาหารเหลว enrichment medium ผสมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ ความเข้มข้นร้อยละ 99 และอาหารเหลว enrichment medium ผสมกลีเซอรอลดิบเพาะเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

2.6.2 เก็บตัวอย่างทุกวันนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และทำการแยกเชื้อโดยวิธี Pour plate นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.6.3 วิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกที่เชื้อผลิตได้ในแต่ละวันจนครบทั้ง 120 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง

3. ผลและวิจารณ์ (Results and Discussion)

3.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างแหล่งต่างๆ

ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ จำนวน 14 แหล่ง ได้แก่ น้ำฮอร์โมนน้ำดำ น้ำผักดอง น้ำหน่อไม้ดอง น้ำเอนไซม์ผสมน้ำผลไม้รวม ปุ๋ยน้ำ น้ำหมักชีวภาพยี่ห้อ

น้องเดือน น้ำหมักชีวภาพยี่ห้อเทศบาล น้ำหมักชีวภาพ EM ดินที่ปนเปื้อนกลีเซอรอลดิบ น้ำทิ้งที่ปนเปื้อนกลีเซอรอลดิบ น้ำหมักชีวภาพจาก จ.เชียงใหม่ น้ำหมักมะกรูด น้ำหมักลูกยอน้ำหมักยี่ห้อพลอยเพชร นำมาคัดเลือกหาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลคติกโดยใช้กลีเซอรอลดิบ เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวตามวิธีการข้อ 2.4 จากผลการทดลองดังตารางที่ 2 พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญบนอาหาร Nutrient agar ที่ผสมกลีเซอรอลดิบได้ 4,884 โคโลนี แต่ส่วนใหญ่มีเกิดวงใสรอบโคโลนี มีเพียงตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ EM ที่เกิดวงใสรอบโคโลนีขึ้น จึงคัดเลือกจุลินทรีย์ EM ให้วงใสรอบโคโลนีกว้างที่สุด จำนวน 18 สายพันธุ์ ได้แก่ EM310, EM321, EM325, EM326, EM327, EM328, EM329, EM330, EM332, EM333, EM334, EM335, EM338, EM339, EM340, EM342, EM343 และ EM383 มาเพาะเลี้ยงตามวิธีการข้อ 2.5 และหาปริมาณกรดแลคติกตามวิธีการข้อ 2.3.1 ผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ EM335 มีขนาดวงใสรอบโคโลนี กว้างที่สุดคือมีขนาด 17.07 มิลลิเมตร (ตารางที่ 3) และสายพันธุ์ EM383 มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

Table 2 Number of microorganisms which separated from various sources

No.	Samples	Number of isolate microorganisms
1	น้ำฮอร์โมนน้ำดำ	613
2	น้ำผักดอง	72
3	น้ำหน่อไม้ดอง	75
4	น้ำเอนไซม์ผสมน้ำผลไม้รวม	เชื้อไม่เจริญ
5	ปุ๋ยน้ำ	เชื้อไม่เจริญ
6	น้ำหมักชีวภาพ ยี่ห้อน้องเดือน	388
7	น้ำหมักชีวภาพยี่ห้อเทศบาล	174
8	น้ำหมักชีวภาพ EM	836
9	ดินที่ปนเปื้อนกลีเซอรอลดิบ	677
10	น้ำทิ้งที่ปนเปื้อน กลีเซอรอลดิบ	1,075
11	น้ำหมักชีวภาพจาก จ.เชียงใหม่	162
12	น้ำหมักมะกรูด	348
13	น้ำหมักลูกยอ	21
14	น้ำหมักยี่ห้อพลอยเพชร	443
	รวม	4,884

Table 3 Clear zone and Lactic acid production of 18 microorganisms which separated from EM bio-extract sample

No.	Microorganism	Clear zone(mm)± SD
1	EM335	17.07±0.30
2	EM334	16.24±0.90
3	EM342	15.20±1.09
4	EM343	13.47±1.46
5	EM326	13.14±1.23
6	EM321	13.08±0.80
7	EM328	12.97±1.72
8	EM340	12.92±0.72
9	EM339	12.06±0.62
10	EM338	11.81±0.81
11	EM329	11.78±0.66
12	EM310	11.75±2.68
13	EM333	10.25±1.98
14	EM383	10.19±0.97
15	EM332	10.08±1.54
16	EM327	8.63±1.87
17	EM330	8.21±0.62
18	EM325	7.70±1.22

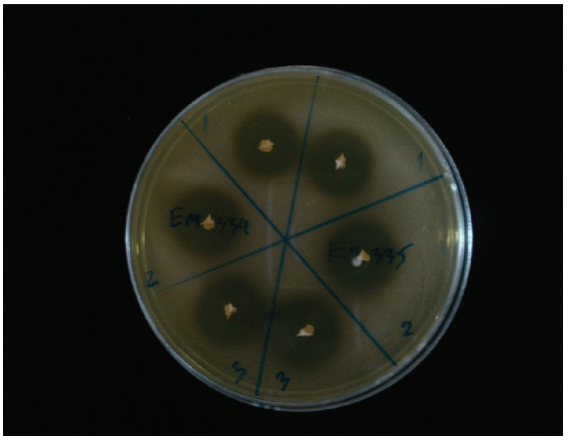

Figure 2 Clear zone of EM335 and EM334

3.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว enrichment medium ผสมกลีเซอรอลดิบ

จากการศึกษา การผลิตกรดแลคติกของเชื้อจุลินทรีย์ EM335, EM383 และ EM335 เลี้ยงรวมกับ EM383 ในอาหารเหลว enrichment medium ผสมกลีเซอรอลดิบ แล้วทำการนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในแต่ละวันจนครบ 5 วัน ตามวิธีการทดลองข้อ 2.6 พบว่าปริมาณเชื้อเจริญสูงสุดในวันที่ 4 มีเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 2x108 CFU/ml หลังจากนั้นเชื้อจะเจริญคงที่และค่อยๆ ลดลงอาจเนื่องมาจากปริมาณอาหารที่ลดน้อยลงหรือมีปริมาณกรดที่เชื้อสร้างเพิ่มสูงขึ้น ผลการทดลองแสดงใน Figure 3

3.3 ศึกษาการผลิตกรดแลคติกของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้กลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน

ตัวอย่างจุลินทรีย์จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ EM335 ที่มีขนาดวงใสรอบโคโลนีกว้างที่สุด EM 383 ซึ่งมีการเจริญเติบโตดีที่สุด และทดลองเพาะเลี้ยง EM335 ผสมกับ EM383 มาศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยใช้กลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนตามวิธีข้อ 2.6 จากการทดลอง พบว่าสายพันธุ์ EM335 ผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุดในวันที่ 4 ปริมาณ 84.76 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวenrichment medium ผสมกลีเซอรอลดิบ

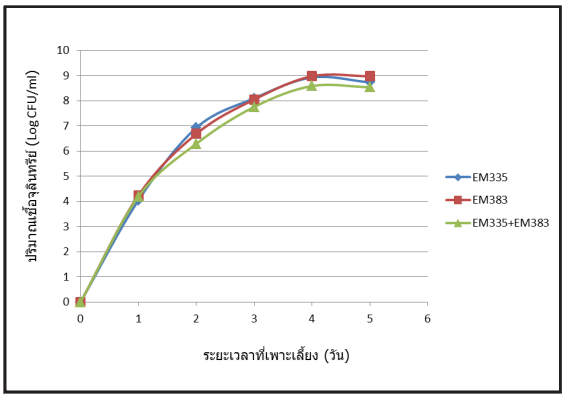

Figure 3 Growth of EM335 and EM383 cultivated in enrichment medium containing crude glycerol for 5 days

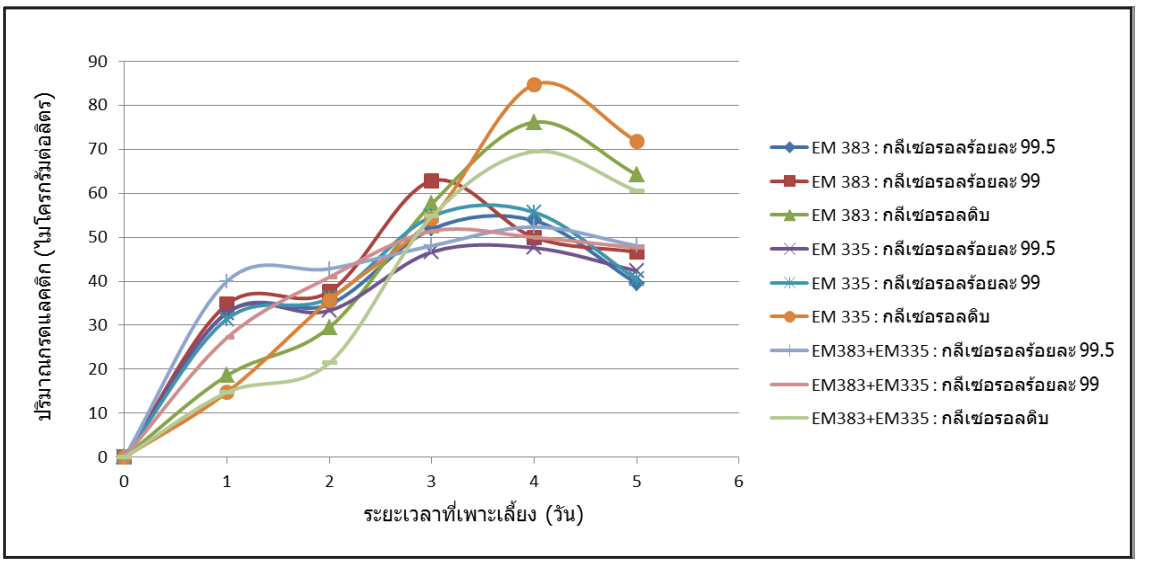

Figure 4 Lactic acid production of EM333 EM335 and EM383 in enrichment medium containing crude glycerol, 99% glycerol and 99.5% glycerol

4. สรุป (Conclusion)

4.1 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ จำนวน 14 แหล่ง ได้แก่ น้ำฮอร์โมนน้ำดำ น้ำผักดอง น้ำหน่อไม้ดอง น้ำเอนไซม์ผสมน้ำผลไม้รวม ปุ๋ยน้ำ น้ำหมักชีวภาพยี่ห้อน้องเดือน น้ำหมักชีวภาพยี่ห้อเทศบาล น้ำหมักชีวภาพ EM ดินที่ปนเปื้อน กลีเซอรอลดิบ น้ำทิ้งที่ปนเปื้อนกลีเซอรอลดิบ น้ำหมักชีวภาพจาก จ.เชียงใหม่ น้ำหมักมะกรูด น้ำหมักลูกยอ น้ำหมักยี่ห้อพลอยเพชร นำมาคัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลคติกโดยใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว พบว่า มีเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ 4,884 โคโลนี แต่ส่วนใหญ่ไม่เกิดวงใสรอบโคโลนี มีเพียงตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ EM ที่เกิดวงใสรอบโคโลนีขึ้น

4.2 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีขนาดวงใสรอบโคโลนีกว้างที่สุด คือ สายพันธุ์ EM335 มีขนาดวงใส 17.07

มิลลิเมตร และตัวอย่างเชื้อที่เจริญได้ดีที่สุด คือ EM383

4.3 นำสายพันธุ์ EM335 และ EM335 ผสมกับ EM383 เพาะเลี้ยงใน enrichment medium ที่ผสมกลีเซอรอลกลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99 และ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 พบว่าสายพันธุ์จุลินทรีย์ EM335 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว enrichment medium ผสมกลีเซอรอลดิบ สามารถผลิตกรดแลคติกได้ปริมาณมากที่สุด 84.76 ไมโครกรัมต่อลิตร

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์บริการที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยตลอดโครงการนี้

6. เอกสารอ้างอิง (References)

(1) Dasari, M.A., P.P. Kiatsimkul, W.R. Sutterlin, and G.J. Suppes. "Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. Applies Catalysis A." General., 2005, 281(1-2): 225-231

(2) Pachauri, N. and B. He. "Value-added utilization of crude glycerol from biodiesel production: a survery of current research activities." The 2006 ASABE Annual International Meeting, Oregon Convention Center, Portland, Oregon 9-12 July 2006. http://www.webpages.uidaho.edu

(3) Hong, A.A., K.K. Cheng, F. Peng, S. Zhou , Y. Sun, M.M. Liu and D.H. Liu. "Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid." J. Chem. Technol. Biotechnol., 2009, 84: 1576-1581.

(4) Du, W., W. Li, T. Sun, X. Chen and D.H. Liu. "Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts." Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008, 79: 331-337.

(5) Datta, R., S.P. Tsai, P. Bonsignore, S.H. Moon and J.R. Frank. "Technological and economic potential of poly-lactic acid and lactic acid derivatives." FEMS. Microbiol. Rev., 1995, 16: 221-231.

(6) Rathin, D. and H. Michael. "Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies-a review." J. Chem. Technol. Biotechnol., 2006, 81: 1119-1129.